

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17605

研究課題名（和文）シングルセル解析を用いた肝細胞癌の血管内腫瘍栓形成メカニズムの解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathology and development of a new treatment for hepatocellular carcinoma through single-cell analysis

研究代表者

國土 貴嗣（Kokudo, Takashi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40802921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：シングルセル解析を用いて47例（HBV陽性例19例、HCV陽性例12例、nonBnonC例16例）の肝細胞癌の遺伝子解析を行い、特定の遺伝子を発現する肝星細胞が肝細胞癌の増殖に重要であることを報告した（Myojin Y, Sugiyama M, Kokudo N, et al. Gastroenterology. 2021 Apr;160(5):1741-1754.e16.）。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
細胞構成データに基づいた肝細胞癌の治療標的となる遺伝子の抽出を行い、肝細胞癌や周辺細胞に対する新規の分子標的治療薬の開発へつなげることができた。

研究成果の概要（英文）：We performed scRNA-seq in 47 cases including 19 hepatitis B virus positive cases, 12 hepatitis C virus positive cases, and 16 non B non C cases, and reported that hepatic stellate cells expressing specific genes are important for the growth of hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：シングルセル解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

血管内腫瘍栓を合併した原発性肝細胞癌は欧米のガイドラインでは advanced stage に分類され、推奨されている治療法は分子標的薬のみである。しかしながら、その予後延長効果は3ヵ月程度であり、生存期間中央値も8ヵ月と十分でない。一方、国内を中心としたアジア諸国では積極的な外科切除が行われており、特に頻度の高い門脈腫瘍栓において外科的切除により良好な成績を得られる可能性があることは報告されてきたが、ガイドラインとして推奨されるエビデンスレベルの高い研究はこれまで存在しなかった。研究代表者の國土は大規模多施設データベースである肝癌研究会追跡調査結果の解析を通して、門脈腫瘍栓合併肝細胞癌に対する外科的切除は他の治療法と比較してその予後を延長させることを証明した(Kokudo T, et al. J Hepatol 2016;65:938-943.)。一方、頻度が門脈腫瘍栓と比べると稀である静脈腫瘍栓に関しても研究代表者の國土は東京大学肝胆膵外科における切除例の検討により、外科切除が有効であることを報告した(Kokudo T, et al. J Hepatol 2014;61:583-588)。さらにこの結果を前述の肝癌研究会追跡調査結果の解析を用いて検証し、下大静脈浸潤のない肝静脈腫瘍栓合併肝細胞癌の生存期間中央値は4年以上であることを報告した(Kokudo T, et al. Hepatology 2017;66:510-517)。この結果を受け2017年に改訂された肝癌診療ガイドラインでは血管内腫瘍栓合併肝細胞癌の治療アルゴリズムにおいて手術が治療法として明記された。

しかしながら、血管内腫瘍栓合併肝細胞癌は既に進行しており、切除適応とならない症例も多く、切除後の再発率も極めて高率であり、血管内腫瘍栓合併肝細胞癌に対して有効な治療薬の開発は急務の課題である。血管内腫瘍栓に対して有効な治療法が開発が立ち遅れている原因としてその成因および病態が解明されていないことが理由の一つとして挙げられる。研究代表者の國土はマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析により、門脈腫瘍栓合併肝細胞癌の腫瘍栓において原発巣と比較して発現の変化している遺伝子群を同定し、報告した(Kokudo T, et al. J Clin Oncol 35, 2017; abstract 301)。その中でも細胞接着に関わる遺伝子の発現が腫瘍栓と原発巣で大きく異なっており、特に細胞接着因子として肝細胞癌で重要であると報告されている E-cadherin の発現が普遍的に腫瘍栓において低下していることを切除標本を用いた免疫染色により証明した。この E-cadherin の発現低下を抑制する薬剤の候補として c-met 阻害薬を同定し、肝癌細胞株を用いた in vitro, in vivo の実験において、c-met 阻害薬が E-cadherin の発現を上昇させ、治療薬として期待されることを報告した。しかしながら、マイクロアレイなどのこれまでの解析方法は組織全体をバルクで解析するため、組織内の多様性を十分に解析することができず、血管内腫瘍栓を形成している癌細胞に有効な薬剤を検索するには限界があった。そこで、研究代表者の國土は共同研究者の杉山と共同して、近年報告されてきた新しい技術である1細胞での全 RNA シークエンス解析技術 (single cell RNA sequence: scRNA-seq) を用いて肝細胞癌を構成する全細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することに成功した。本研究ではこの比較的新しい技術である scRNA-seq 解析を利用した肝細胞癌の血管内腫瘍栓形成メカニズムの解明と新規治療薬の開発を目的としている。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管内腫瘍栓合併肝細胞癌の原発巣と腫瘍栓それぞれに対して scRNA-seq を行い、それぞれの癌の構成細胞を明らかにすることで、それぞれの腫瘍の性質を明らかにし、有効な新規治療法を開発を目標としている。また、scRNA-seq からデータ解析までの一連の流れが既に実施可能であるため、迅速なデータ取得と解析が実現できる。このように、scRNA-seq は今まで組織全体の遺伝子を検査するバルク解析では全く得ることができなかった新しい細胞集団、遺伝子発現の違いを同定することが目的である。

## 3. 研究の方法

血管内腫瘍栓合併肝細胞癌の成因・病態を明らかにすることを目的として 原発巣および腫瘍栓それぞれでの scRNA-seq 解析、新規の治療ターゲットとなりうる遺伝子の臨床的・基礎的検討を行う。門脈腫瘍栓合併肝細胞癌の切除症例5例を対象として原発巣、腫瘍栓それぞれに scRNA-seq 解析を行い、構成する細胞種の同定・遺伝子発現パターンを解析する。また、既に解析済の癌部および非癌部における23.5万個の細胞の scRNA-seq の結果と比較検討することで、腫瘍栓を形成しやすい癌細胞に特徴的な遺伝子群の同定を行う。これらの結果に細胞系譜解析を追加することで腫瘍栓形成メカニズムの全容を解明する。

## 4. 研究成果

近年報告されてきた新しい技術である 1 細胞での全 RNA シークエンス解析技術 (single cell RNA sequence: scRNA-seq) を用いて肝細胞癌を構成する全細胞の遺伝子発現を網羅的に解析するプロトコールを作成することに成功した。scRNA-seq は今まで組織全体の遺伝子を検査するバルク解析では全く得ることができなかつた新しい細胞集団、遺伝子発現の違いを同定することが可能であり、癌の性質を解明する上で有用な新規アプローチを創出できたと考えられる。また、実際にシングルセル解析を用いて 47 例 (HBV 陽性例 19 例、HCV 陽性例 12 例、nonBnonC 例 16 例) の肝細胞癌の遺伝子解析を行い、特定の遺伝子を発現、分泌する肝星細胞が肝細胞癌の増殖に重要であることを報告した。(Myojin Y, Sugiyama M, Kokudo N, et al. Gastroenterology. 2021 Apr;160(5):1741-1754.e16.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Yoichi Sasaki, Kenji Fukumoto, Sadatsugu Sakane, Yuki Makino, Nobuyuki Takemura, Ryoko Yamada, Minoru Shigekawa, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Shogo Kobayashi, Tomohide Tatsumi, Hiroshi Suemizu, Hidetoshi Eguchi, Norihiro Kokudo, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara	4. 巻 160
2. 論文標題 Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Promote Tumor Growth Via Growth Differentiation Factor 15 Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1741-1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.12.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------